

## **ARTICLES ORIGINAUX**

# **Encéphalomyélite porcine à Madagascar : Essais de vaccination par aérosol**

par P. BOURDIN, H. SERRES, P. RASOLOFOMANANA

avec la collaboration technique de E. RAKOTOZANANY et E. RAKOTONDRAMARY

### **RÉSUMÉ**

Des essais de vaccination contre la poliomyélite du porc, par inhalation d'aérosols ont été effectués à Madagascar.

La méthode a donné des résultats concluants à l'aide d'un virus vivant. Quelques cas de maladie post-vaccinale obligent à n'utiliser le vaccin qu'en zones contaminées.

L'apparition de l'immunité est hâtée par la hyaluronidase. Des recherches pour améliorer le titre virulent, et pour améliorer la conservation du virus-vaccin n'ont pas permis de dégager des méthodes concluantes.

Depuis 1959, la prophylaxie contre l'encéphalomyélite du porc est faite à Madagascar à l'aide d'un vaccin préparé sur cellules rénales de porcelet (1), formolé à 1,5 p. 1.000, puis adsorbé sur hydroxyde d'alumine. Ce vaccin nous a donné de bons résultats, mais il a l'inconvénient de nécessiter deux injections de 5 ml par la voie sous-cutanée à quinze jours d'intervalle, et confère une immunité qui ne dure que six mois. Son transport et sa conservation doivent se faire entre + 5° C et 8° C, ce qui nécessite l'emploi de coffres isothermes encombrants et la présence d'armoires frigorifiques dans tous les postes du Service de l'Élevage.

Tous ces impératifs en limitent l'utilisation aux régions dont l'accès est facile. Dans le cas contraire, l'agent du Service de l'Élevage ne peut faire qu'une seule injection avec parfois un vaccin mal conservé.

Pour lutter plus efficacement contre l'encéphalomyélite porcine et permettre l'extension de l'élevage du porc, le Gouvernement de la République Malgache demanda en 1961 au Laboratoire Central de l'Élevage de Tananarive d'entreprendre l'étude d'un vaccin relativement ther-

mostable, ne nécessitant qu'une intervention et pouvant se transporter sous un faible volume.

En étudiant l'épidémiologie de l'encéphalomyélite porcine, SERRES (2) montra que le virus introduit par la voie nasale en faible quantité sous la forme d'aérosol, provoquait une maladie classique chez le jeune porcelet sevré.

Nous référant à ces travaux, nous avons envisagé d'utiliser cette voie pour la vaccination des animaux, en introduisant sous la forme de très fines gouttelettes dans les narines, un vaccin constitué par un virus vivant, modifié par passages sur cellules rénales de porcelets.

Pour que la vaccination présente les meilleures chances d'efficacité, il était nécessaire qu'une quantité maximum de virus atténué atteigne effectivement les centres nerveux du porcelet.

Cette nécessité imposait les aspects des recherches que nous allons décrire :

1° Mettre au point une méthode de préparation qui fournisse une solution possédant un haut titre en virus vivant atténué.

2° Déterminer sous quelle forme le virus vaccin serait capable de se conserver au mieux depuis la fabrication jusqu'à l'acte vaccinal.

3° Déterminer si on ne pouvait favoriser la pénétration du virus vers les centres nerveux.

Pour exécuter les protocoles expérimentaux, nous avons d'abord travaillé par titrages en cultures cellulaires, puis vérifié nos résultats sur porcelets.

## I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. — Cultures cellulaires.

Nous utilisons la méthode mise au point par DULBECCO et VOGT (3), et perfectionnée par YOUNGER (4), appliquée aux reins de jeunes porcelets âgés de 15 jours à 1 mois. Le tissu rénal est haché très finement, prédigéré pendant 30 minutes à la température du Laboratoire et digéré 4 à 5 heures à  $+5^{\circ}\text{C}$ , selon la technique décrite par DANIEL et DEPOUX (5). La trypsine utilisée est mise en solution dans du milieu de Hanks B S S à 0,25 p. 100.

Nous utilisons comme milieu de croissance une solution de Earle contenant de l'hydrolysate enzymatique de lactalbumine à 0,5 p. 100 et du sérum de veau à 5 p. 100. Nous obtenons sur boîte de Jouan en verre pyrex une couche monocellulaire complète en 4 à 5 jours. Les boîtes sont placées dans une étuve dont la température est réglée à  $38^{\circ}\text{C}$ .

Après élimination du milieu de croissance, le liquide virulent est introduit à raison de 10 ml par boîte. Le contact virus-cellules se fait pendant une heure à la température du laboratoire. Nous introduisons le milieu d'entretien décrit par LEPINE, SLIZEWICZ et Coll. (6) ; il est constitué par une solution de Earle, enrichie par de l'hydrolysate de caseine à 0,5 p. 1.000 et contient des vitamines et de la cystéine aux concentrations recommandées par EAGLE (7), de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ -tocophérol aux concentrations recommandées par LEPINE, DANIEL et Coll. (8) pour les cellules rénales de singe. Nous ajustons le pH du milieu avant l'emploi à 7,8 avec de la soude normale.

Les cultures sont remises à l'étuve à  $38^{\circ}\text{C}$  et sont examinées environ 20 à 24 heures après ; l'effet cytopathique du virus de Teschen se traduit par un arrondissement des cellules, accompagné de lyse du cytoplasme : lorsque nous constatons que les 8/10 du tapis sont lysés, nous

congelons les boîtes à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Le virus est récolté après décongélation, puis conservé à  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Nous vérifions le titre de la suspension virulente par la recherche de l'effet cytopathique sur cellules rénales de porcelets cultivées sur tubes de 16 mm en verre pyrex. Le milieu de croissance est identique au précédent. Le milieu d'entretien est constitué par du milieu de Schwöbel modifié :

— NaCl .....	8 g
— KCl .....	0,3 g
— $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,24 g
— $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0,2 g
— $\text{NaHCO}_3$ .....	2 g
— eau déminéralisée .....	1.000 ml

Ce milieu est ajusté à pH 7,8 avec la soude normale, puis reçoit du glucose à 1,98 g p. 1.000 et de l'hydrolysate de lactalbumine à 1 g p. 1.000. Il est filtré sur Seitz et au moment de l'emploi, nous ajoutons du sérum de veau, des vitamines aux taux prescrits par EAGLE (7) et de l' $\alpha$ -tocophérol.

Soit pour 950 ml de milieu :

- 50 ml de sérum de veau
- 1 ml de solution de vitamines du groupe B
- 1 ml d'acide folique en solution à 1 p. 1.000
- 0,5 ml d'une solution alcoolique d' $\alpha$ -tocophérol à 2 p. 1.000

Nous mettons 0,2 ml d'inoculum dans les tubes, puis après un temps de contact de 1 heure à la température du laboratoire nous introduisons 2 ml du milieu précédent. Les lectures sont faites du 2<sup>e</sup> au 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation.

### B. — Souches utilisées.

Toutes les souches utilisées dérivent du cerveau d'un porcelet mort d'encéphalomyélite à Antsirabe en 1960, d'où la dénomination principale « A ».

Le numéro suivant cette lettre, indique le nombre de passages de la souche en cultures cellulaires de rein de porcelet.

Les expériences successives qui ont été réalisées nous ont conduit à utiliser la souche après qu'elle ait subi des passages de plus en plus nombreux.

### C. — Animaux.

Nous avons utilisé des porcelets sevrés de race Large White âgés de 2 à 3 mois, provenant d'é-

levages indemnes d'encéphalomyélite porcine depuis plusieurs années. Les animaux sont isolés quinze jours avant leur utilisation et, pendant cette période, débarrassés de leurs ascarides par un traitement à l'adipate de pipérazine à la dose de 35 cg par kg.

#### D. — Appareils pour vaccination par voie nasale

Nous avons utilisé dans une première expérience un appareil à aérosol \* puis par la suite, un pulvérisateur à poire \*\* servant à vaporiser des solutions anesthésiques en très fines gouttelettes. Avec cet appareil, les animaux reçoivent cinq vaporisations dans chaque narine, soit environ 0,5 ml par animal.

#### E. — Epreuve virulente des animaux.

Les porcelets sont éprouvés par la voie intracérébrale en introduisant 1.000 DL 50 de virus virulent ; seuls sont estimés comme non-protégés les animaux présentant des signes paralytiques entre le 6<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jour après l'épreuve.

#### F. — Examen des animaux malades.

Les animaux gravement paralysés ou morts sont autopsiés. La moelle lombaire et le bulbe sont prélevés et nous ne considérons comme positifs que les animaux chez qui nous trouvons des manchons périvasculaires et des amas de neuronophagie.

## II. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

#### A. — Essai de vaccination par voie nasale avec virus modifié.

Nous avons vacciné 15 animaux avec la souche A 15 à l'aide d'un appareil à aérosol de type médical et 5 animaux avec un vaporisateur.

Pour le 1<sup>er</sup> lot, nous avons laissé les animaux en contact pendant 2 minutes avec le brouillard produit par l'appareil. Pour le 2<sup>e</sup> lot, nous avons fait 5 vaporisations au niveau de chaque narine. Les animaux ont été éprouvés 1 mois après la vaccination. Entre le 18<sup>e</sup> et le 23<sup>e</sup> jour après la vaccination, nous avons observé 5 cas de paralysie : 3 dans le 1<sup>er</sup> lot qui ont été suivis de guérison

spontanée en 5 à 10 jours, et 2 dans le 2<sup>e</sup> lot qui se sont terminés par la mort entre 4 et 7 jours après le début des paralysies.

Les signes histopathologiques étaient positifs. Un autre animal du 1<sup>er</sup> lot est mort brusquement sans signes cliniques ni lésions histopathologiques. Les 17 animaux restants ont été éprouvés. Un seul a été frappé de troubles paralytiques, et a succombé avec des lésions histologiques de poliomyélite ; 16 ont parfaitement résisté.

#### Conclusions.

Cette première expérience nous montre que la vaccination par voie nasale est possible mais que la souche passée 15 fois sur cellules rénales de porcelets est insuffisamment atténuée.

#### B. — Etude de l'apparition de l'immunité.

Nous avons employé dans cette expérience, comme dans toutes celles qui vont suivre, un vaporisateur à poire. Nous avons vacciné 32 animaux avec la souche A 17 (17 passages sur cellules rénales de porcelet) et fait l'épreuve aux époques suivantes : J + 1, J + 3, J + 5, J + 8, J + 10), J étant le jour de la vaccination.

Nous avons observé les résultats suivants :

J + 1 ....	4 porcelets éprouvés	4 paralysés
J + 3 ....	4 —	4 —
J + 5 ....	4 —	4 —
J + 8 ....	4 —	3 —
J + 10 ....	10 —	4 —
J + 20 ....	6 —	1 —

L'immunité s'installe donc progressivement du 8<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour.

#### C. — Nécessité d'un virus vivant.

Nous avons pu montrer que les animaux immunisés par la voie nasale à l'aide d'un vaccin inactivé n'étaient pas protégés.

Nous avons pris 4 porcelets qui ont reçu par voie nasale la souche A 25 inactivée par le formol à 1,5 p. 1.000 ; cette inactivation se faisant pendant 24 heures au réfrigérateur.

Les animaux ont été éprouvés 20 jours après la vaccination tous ont été atteints de paralysies accompagnées de signes d'encéphalite. Nous avons relevé des lésions caractéristiques au niveau du bulbe et de la moelle lombaire.

Cette expérience nous montre que le virus

\* Brumisateur L1 Geosyl, Saint-Denis (Seine).

\*\* CHOPELIN, 22, Square Montsouris, Paris.

modifié doit être vivant pour pouvoir protéger les animaux lors de la vaccination par la voie nasale.

### III. — RECHERCHE DES CONDITIONS PERMETTANT UNE MEILLEURE PRODUCTION DU VIRUS VACCIN

#### A. — Effet de la concentration en ion $Mg^{++}$ après inoculation du virus.

BACTHOLD et Coll. (9) ont observé que l'ion  $Mg^{++}$  à la concentration 0,001 M dans le milieu de culture favorise la fixation du virus poliomyélique sur la cellule. WALLIS et MELNICK (10) montrèrent que le chlorure de magnésium à la concentration de 0,025 M par litre introduit dans le milieu 24 heures avant l'inoculation du virus poliomyélique provoque l'apparition plus précoce de l'effet cytopathique pour les types 1, 2 et 3, et que, si pour les types 1 et 2 le titre est augmenté de 1 logarithme décimal, il reste sans changement pour le type 3.

Nous avons étudié l'action du chlorure de magnésium et du sulfate de magnésium sur l'augmentation de la sensibilité de la cellule rénale de porcelet au virus de l'encéphalomyélite porcine modifié.

Nous avons ajouté au milieu Earle-hydrolysate de caséine (6), utilisé comme milieu d'entretien après inoculation, des suppléments variables de  $SO_4Mg$ , 7  $H_2O$  et de  $Cl_2Mg$ , 6  $H_2O$  (Tableau I).

TABLEAU N° I

$SO_4 Mg$ M/1.000	$Cl_2 Mg$ M/1.000	Lyse en 24 heures Pourcentage du tapis	Titre
0	0	80	$10^{7,2}$
1	0	80	$10^{7,4}$
5	0	100	$10^{7,5}$
10	0	20	$10^{4,8}$
20	0	20	$10^{5,2}$
0	1	80	$10^{7,6}$
0	5	100	$10^{7,6}$
0	10	20	$10^{5,8}$
0	20	20	$10^{5,4}$

La concentration de 0,005 M en ion  $Mg^{++}$  paraît accélérer la lyse cellulaire, mais les concentrations supérieures sont néfastes.

#### B. — Action des hormones sur la sensibilité des cellules au virus de l'encéphalomyélite porcine

##### 1) Action de l'extrait thyroïdien.

BATON, ADLER et Coll. (11) étudièrent l'action de la thyroxine et de la tri-iodothyroxine sur la multiplication du virus de la grippe cultivé sur fibroblastes d'embryon de poulet. ROIZMAN (12) montra que l'extrait thyroïdien n'avait pas un effet très net sur le titre final du virus de l'herpès cultivé sur cellule H E P — 2.

Nous avons utilisé un extrait lyophilisé de thyroïde\* qui a été introduit dans le milieu après inoculation du virus modifié à la dose de 1 mg d'extrait par ml de milieu. En même temps, nous avions des témoins sans extrait thyroïdien. Nous avons observé au bout de 24 heures dans les boîtes contenant l'extrait thyroïdien, que la lyse était complète, alors que dans les boîtes témoins où il restait encore des amas cellulaires, la dégénérescence n'atteignait que 80 p. 100 du tapis.

Nous avons ensuite procédé au titrage des deux souches et nous avons obtenu  $10^{7,8} DL_{50} CT/ml$  pour la souche A 25 normale et  $10^{7,7} DL_{50} CT/ml$  pour la souche A 25 en milieu contenant l'extrait thyroïdien, ce qui ne constitue pas une différence significative.

##### 2) Action de l'hydrocortisone.

SIGEL et BEASLEY (13) étudièrent l'action de la cortisone sur les cellules Hela inoculées avec le virus poliomyélique ; ils constatèrent que la cortisone introduite à la dose de 0,25 mg/ml retarde l'apparition de l'effet cytopathogène quand elle est introduite au moment de la croissance de ces cellules et éliminée par lavage avant l'inoculation. KAARINAINEN et HALONEN (14) montrèrent que la concentration de 10  $\mu g/ml$  et 100  $\mu g/ml$  l'hydrocortisone agit peu sur le titre final du virus louping-ill cultivé sur cellules amniotiques humaines.

Nous avons utilisé pour notre part le succinate double d'hydrocortisone et de sodium lyophilisé\*\*, qui a été introduit à la dose de 1  $\mu g$  ou 10  $\mu g/ml$  de milieu, soit au moment de l'inoculation avec le tapis cellulaire. Dans les deux cas, après

\* Laboratoire Jean ROY — FREYSSINGE, 6, rue Alain Chartier, Paris.

\*\* Laboratoire ROUSSEL, 35 Boulevard des Invalides — Paris.

tion soit aussitôt après la fin du contact du virus examen des boîtes au bout de 24 heures, nous avons constaté qu'en présence d'hydrocortisone, l'effet cytopathogène était plus complet sur les cellules ayant reçu de la cortisone que sur les témoins.

Nous avons procédé au titrage de la suspension virulente obtenue dans un milieu contenant de la cortisone à raison de  $1 \mu\text{g/ml}$  et avons obtenu  $10^{8,6}$  DL<sub>50</sub>CT/ml alors que la DL<sub>50</sub>CT pour la souche normale est de  $10^{7,8}$ /ml.

Nous avons étudié aussi l'action de l'insuline sur la multiplication du virus de l'encéphalomyélite porcine, mais nous n'avons pas obtenu d'augmentation du pouvoir infectant pour les cellules.

Dans l'ensemble, après cette étude de l'action de différents agents chimiques ou biologiques, nous remarquons que les agents retenus dans notre exposé ont la propriété d'accélérer l'apparition de l'effet cytopathogène du virus de l'encéphalomyélite porcine, et d'en accroître légèrement le titre.

Nous avons l'habitude de récolter le virus A 25 après congélation-décongélation, quand il a déterminé 80 p. 100 de lyse sur le tapis cellulaire. Or, MANDEL (15) montra que la congélation-décongélation ne permet de récupérer qu'une faible partie du virus dans les cellules. Nous pouvons penser que les différents agents étudiés précédemment, qui interviennent en accélérant l'effet cytopathogène, provoquent une libération plus complète d'unités virulentes dans le milieu de culture.

#### IV. — AMÉLIORATION DE LA CONSERVATION DU VIRUS VACCIN

##### A. — Etude de la conservation par la lyophilisation.

Nous avons tenté à plusieurs reprises de lyophiliser le virus de l'encéphalomyélite porcine sans rien ajouter à la suspension virulente. Chaque fois, nous avons observé une baisse très importante du titre en DL<sub>50</sub>CT.

Nous référant au traité de REY (16) et suivant les opinions de GREAVES (16) nous avons modifié le milieu contenant le virus. Nous avons étudié l'action du saccharose employé par MUGGLETON (17) dans la lyophilisation du B. C. G., du jaune d'œuf, de la peptone, de la gélatine utilisée

par SUREAU (18) pour la lyophilisation du vaccin antirabique et du polyvinyl-pyrrolidone\* utilisé par RENOUX (19) pour la lyophilisation de *Brucella melitensis*.

Nous avons incorporé à la souche A 25 conservée à  $-30^{\circ}\text{C}$  ou fraîchement récoltée, la gélatine, le saccharose, le jaune d'œuf ou la peptone dans des proportions variables, ces corps étant seuls ou associés. Des titrages effectués sur cellules après lyophilisation ont montré que :

— Dans tous les cas, le titre en virus avait considérablement baissé.

Nous avons procédé à la vaccination de porcelets et obtenu les résultats suivants :

— Vaccin lyophilisé contenant 1,2 p. 100 à 0,5 p. 100 de gélatine : 26 porcelets morts sur 32 vaccinés et éprouvés.

— Vaccin lyophilisé contenant 1 à 2 p. 100 de peptone et 10 p. 100 de jaune d'œuf : 7 porcelets morts sur 20 vaccinés et éprouvés.

Nous avons abandonné la lyophilisation à la suite de ces échecs, d'autant plus que ce mode de conservation augmenterait le prix de revient de notre vaccin. La difficulté d'obtenir une lyophilisation correcte paraît rapprocher le virus porcin de celui de la poliomyélite humaine.

##### B. — Etude de la conservation du virus en milieu liquide.

###### 1) Action de l'ion $\text{Mg}^{++}$

WALLIS et MELNICK (20) montrèrent que l'ion  $\text{Mg}^{++}$  à forte concentration stabilisait le virus poliomyélique. MELNICK et coll. (21) préconisèrent par la suite, l'emploi du chlorure de magnésium pour stabiliser le vaccin vivant anti-poliomyélique. Enfin, WALLIS et MELNICK (22) mirent également en évidence l'action stabilisatrice de l'ion  $\text{Mg}^{++}$  vis-à-vis des entérovirus.

Nous avons voulu voir si l'ion  $\text{Mg}^{++}$  avait une action stabilisatrice vis-à-vis du virus de l'encéphalomyélite porcine.

Nous avons étudié l'action du chlorure de magnésium à une concentration  $\frac{\text{M}}{2}$  sur le virus modifié.

\* Specia Paris.

Après 24 heures de conservation du mélange à  $+5^{\circ}\text{C}$ , nous avons vacciné 5 porcelets, et, après épreuve, nous avons observé un cas de paralysie sur les 5 animaux.

Après 18 jours de conservation à  $+5^{\circ}\text{C}$  de ce même mélange, nous avons vacciné 4 porcelets ; après épreuve, nous avons relevé 4 cas de paralysie.

## 2) Action de la cystéine.

POHJANPELTO, (24) étudia l'action stabilisatrice de la L-cystine et de la L-cystéine sur le virus poliomyélitique et montra que ces deux corps augmentaient la résistance du virus poliomyélitique à la température de  $50^{\circ}\text{C}$ .

Nous avons recherché l'action stabilisatrice de la L-cystéine sur le virus de l'encéphalomyélite porcine. Nous nous sommes bornés à l'étude de la L-cystéine en raison de sa solubilité immédiate.

Le milieu Earle-hydrolysate de caséine (6) que nous utilisons contient  $10\text{ }\mu\text{g}$  de L-cystéine par ml. Nous avons ajouté à notre souche A 25 après récolte  $50\text{ }\mu\text{g}$  de L-cystéine par ml. Nous avons préparé les échantillons suivants de vaccin :

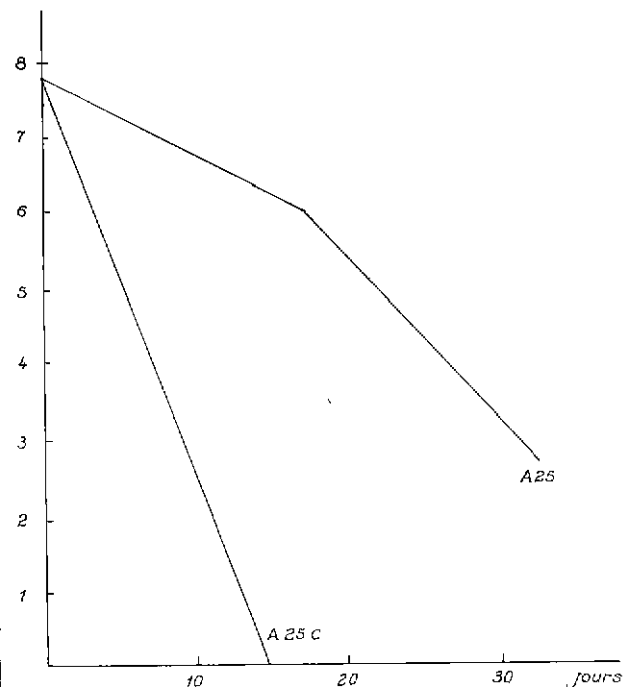
- souche A 25
- souche A 25 + cystéine  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

Ces différentes préparations ont été conservées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 30 jours et nous avons prélevé des ampoules à différentes époques pour titrage sur culture cellulaire. Les résultats obtenus ont été consignés dans le graphique suivant (fig. 1)

A l'examen du graphique, nous constatons que la L-cystéine ajoutée au milieu Earle-hydrolysate de caséine ( $10\text{ }\mu\text{g}$  de cystéine par ml) à la dose de  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  détermine l'inactivation rapide de la suspension virulente quand celle-ci est maintenue à  $+30^{\circ}\text{C}$ .

Nous avons voulu vérifier si à la concentration étudiée ( $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), la L-cystéine ne modifiait pas le pouvoir immunigène du vaccin vivant. Nous avons pris la souche A 25 et la souche A 25 contenant  $60\text{ }\mu\text{g}$  de L-cystéine par ml. Ces deux vaccins conservés à  $-30^{\circ}\text{C}$  titraient  $10^{7.8}\text{DL}_{50}\text{CT/ml}$ , ce qui est largement suffisant pour permettre la vaccination par voie nasale. Nous avons vacciné par cette voie 6 porcs avec chacun des vaccins. Après l'épreuve, nous avons constaté les résultats suivants :

- pour le vaccin avec cystéine :



GRAPHIQUE I

A 25 = Souche dans milieu normal ( $10\text{ }\mu\text{g}$  cystéine /ml)  
 A 25 C = Souche dans milieu normal +  $50\text{ }\mu\text{g}$  de cystéine/ml

5 cas de paralysie sur 6 animaux vaccinés et éprouvés.

— pour le vaccin sans cystéine :

1 mort sur 6 animaux vaccinés et éprouvés.

Nous ne pouvons expliquer le rôle de la cystéine comme inhibiteur du pouvoir immunigène de la souche A 25. Mais nous en avons conclu que toute modification du vaccin, malgré le maintien d'une  $\text{DL}_{50}\text{CT}$  élevée devait nécessairement s'accompagner d'une vérification sur les animaux.

## 3) Action du polyvinyl-pyrrolidone et du glutamate de sodium.

Le polyvinyl-pyrrolidone est employé pour la conservation de *Brucella melitensis* à l'état lyophilisé par RENOUX (19), le glutamate de sodium est aussi utilisé par OBAYASHI (26) dans la lyophilisation du B. C. G. Nous avons voulu rechercher l'effet de ces deux corps dans la stabilisation du virus de l'encéphalomyélite porcine en milieu liquide.



Nous avons utilisé 2 souches :

- A 25 thyroïde 1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $10^{7,7}\text{DL}_{50}\text{CT/ml}$  = A 25 T
- A 25 hydrocortisone 1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $10^{9,6}\text{DL}_{50}\text{CT/ml}$  = A 25 C

Aux souches A 25 C et A 25 T, nous avons ajouté soit 5 p. 100 de polyvinyl-pyrrolidone, soit 5 p. 100 de glutamate de sodium, soit 2,5 p. 100 de polyvinyl-pyrrolidone et 2,5 p. 100 de glutamate de sodium, ce qui nous a donné les vaccins suivants :

- A 25 C 5 p. 100 de polyvinyl-pyrrolidone = A 25 Ca
- A 25 C 5 p. 100 de glutamate de sodium = A 25 Cb
- A 25 C 2,5 p. 100 de polyvinyl-pyrrolidone + 2,5 p. 100 de glutamate = A 25 Cc
- A 25 T 5 p. 100 polyvinyl-pyrrolidone = A 25 Ta
- A 25 T 5 p. 100 glutamate de sodium = A 25 Tb
- A 25 T 5 p. 100 polyvinyl-pyrrolidone + 2,5 p. 100 de glutamate = A 25 Tc

Chacun de ces vaccins a été laissé en même temps à la température du laboratoire ( $+20^\circ\text{C}$  à  $+25^\circ\text{C}$ ) pendant un mois et à  $+5^\circ\text{C}$  pendant 2 mois. Nous avons titré régulièrement chacun des lots de vaccin, ce qui nous a permis d'obtenir la variation du pouvoir infectant pour les cellules, exprimée en  $\text{DL}_{50}\text{CT/ml}$  en fonction de temps pour une température donnée (graphiques 2, 3, 4, 5).

Nous constatons qu'à la température du laboratoire, nous avons obtenu le meilleur résultat avec le mélange polyvinyl-pyrrolidone et glutamate de sodium, suivi par le glutamate de sodium et le polyvinyl-pyrrolidone. Par contre, à  $+5^\circ\text{C}$ , aucune amélioration n'est observée par rapport à la conservation de la souche telle que récoltée.

L'addition de polyvinyl-pyrrolidone ne peut pas être conseillée, pas plus que celle du glutamate ou de leur association dans la pratique.

## V. — AMÉLIORATION DE LA PÉNÉTRATION DU VIRUS-VACCIN

### A. — Action de l'hyaluronidase comme facteur de diffusion dans la vaccination par la voie nasale.

Nous avons utilisé pour la vaccination des animaux, la souche A 25 qui, inoculée par la voie intracérébrale à 5 porcelets, n'a provoqué aucune manifestation clinique.

La souche A 25, après sa décongélation, est utilisée pour dissoudre l'hyaluronidase\* desséchée à raison de 150 UI pour 20 ml de vaccin. La mise en solution de l'hyaluronidase est faite juste avant la vaccination.

Nous avons vacciné 49 animaux avec la souche A 25 contenant de l'hyaluronidase\*\* et 9 animaux avec A 25 sans hyaluronidase. Les animaux du premier lot ont été éprouvés à des époques variables, tandis que ceux du deuxième lot étaient éprouvés le 20<sup>e</sup> jour après la vaccination.

— Premier lot A 25 + Hyaluronidase :

	Eprouvés	Paralysés	Résistants
	—	—	—
J + 0	4	4	0
J + 3	5	5	0
J + 5	17	3	14
J + 10	10	1	9
J + 20	19	2	17

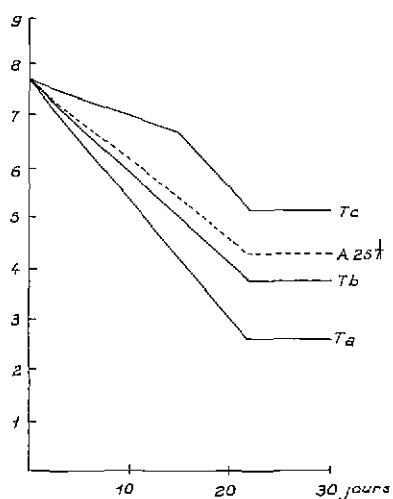
— Deuxième lot A 25 sans Hyaluronidase :

J + 20	9	3	6
--------	---	---	---

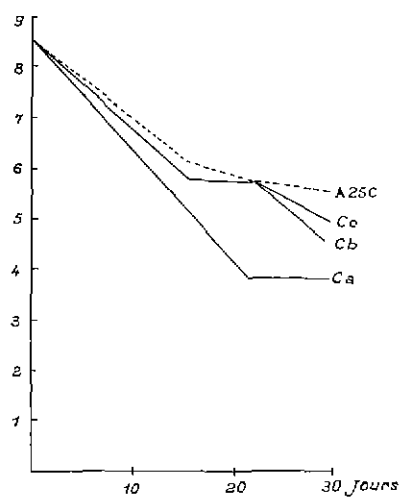
En comparant ces résultats à ceux de l'expérience préliminaire, nous notons que l'hyaluronidase active très nettement la diffusion du virus modifié introduit par la voie nasale, car à J + 5 nous avons antérieurement 4 morts sur 4 tandis que cette fois-ci nous avons seulement 3 morts sur 17 vaccinés.

\* Hyaluronidase Choay : 48, avenue Théophile-Gautier, Paris.

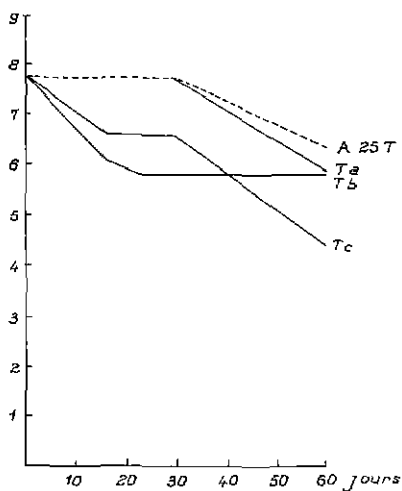
\*\* Hyaluronidase Clin-Byla : 22, rue des Fossés St-Jacques, Paris.



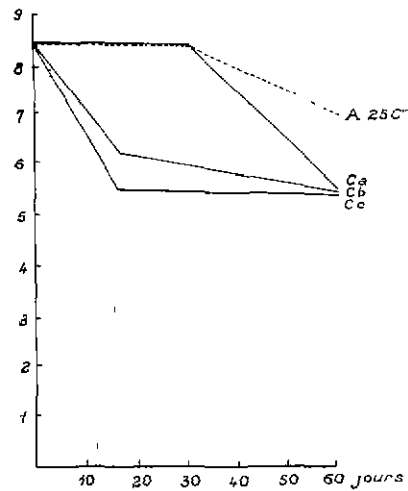
GRAPHIQUE n° 2  
(courbes de variation de A 25T,  
A 25 Ta, A 25 Tb, A 25 Tc à la  
température du Laboratoire).



GRAPHIQUE n° 3  
(courbes de variation de A 25C,  
A 25 Ca, A 25 Cb, A 25 Cc, à la  
température du Laboratoire).



GRAPHIQUE n° 4  
(Courbes de variation de A 25T,  
A 25 Ta, A 25 Tb, A 25 Tc, à la  
température de + 5° C).



GRAPHIQUE n° 5  
(Courbes de variation de A 25 C,  
A 25 Ca, A 25 Cb, A 25 Cc, à la  
température de + 5° C).



## B. — Effet de la température sur la conservation du vaccin nasal contenant de l'hyaluronidase.

La souche A 25 contenant 150 UI d'hyaluronidase pour 20 ml a été conservée aux températures suivantes :

Lot n° 1 ..... 8 jours à + 30° C  
 Lot n° 2 ..... 30 — à + 5° C  
 Lot n° 3 ..... 30 — à — 30° C

Après les huit jours à + 30° C, le lot n° 1 a été mis à — 30° C. Nous avons vacciné par la voie nasale 6 animaux par lot et fait l'épreuve 5 jours après la vaccination.

Lot n° 1 : 6 vaccinés, 6 éprouvés, 6 paralysés, 0 résistants.

Lot n° 2 : 6 vaccinés, 6 éprouvés, 3 paralysés, 3 résistants.

Lot n° 3 : 6 vaccinés, 6 éprouvés, 0 paralysé, 6 résistants.

En sus de l'inactivation spontanée du virus dans le milieu de culture, l'hyaluronidase inactive le virus, rapidement à + 30° C et plus lentement à + 5° C. Du reste, par la suite, nous avons pu conserver du vaccin sans hyaluronidase pendant des périodes plus longues à + 25° C et à + 5° C.

Nous avons dû renoncer à l'emploi de l'hyaluronidase dans notre vaccin même en ne l'introduisant qu'au moment de l'emploi, la technique de vaccination par la voie nasale devant être simple. Cependant, l'hyaluronidase peut et doit être utilisée dans un cas bien particulier, lorsque dans une porcherie la maladie vient d'apparaître

et qu'une immunité rapide est nécessaire pour gagner de vitesse la contamination.

## VI. — CONTROLES EXPERIMENTAUX

### A. — Vaccination avec les lots conservés à la température du Laboratoire.

A la lumière des résultats précédemment acquis, nous avons vacciné des jeunes porcelets âgés de 60 à 80 jours par la voie nasale.

Avec les lots de vaccins A 25 Ca, A 25 Cb et A 25 Cc conservés 15, 21 et 30 jours à la température du Laboratoire, nous avons vacciné 36 porcelets à raison de 4 animaux par lot.

Avec les lots A 25 Tc conservés 15, 21 et 30 jours à la température du Laboratoire, nous avons vacciné 12 porcelets à raison de 4 animaux par lot.

Avec les lots A 25 conservés 15, 21 et 30 jours à la température du Laboratoire, nous avons vacciné 12 porcelets à raison de 4 animaux par lot.

En même temps, nous avons conservé un lot de 4 animaux à titre de témoins. Nous devons préciser que toutes ces vaccinations ont été faites en même temps. Les lots de vaccins mis à la température du Laboratoire pendant des périodes de temps différentes ont été stockés à — 30° C. Ces différents lots de vaccin étaient mis dans des ampoules de verre neutre scellées.

Les animaux vaccinés et les témoins ont tous été éprouvés 20 jours après la vaccination. Les résultats sont rassemblés au tableau n° 2.

TABLEAU N° II

Souches	Vaccinés	morts après vaccination	Eprouvés	morts après épreuve	Résistants
A 25 15	4	—	4	1	3
A 25 21	4	—	4	—	4
A 25 30	4	—	4	—	4
C a 15	4	1	3	—	3
C a 21	4	—	4	—	4
C a 30	4	—	4	—	4
C b 15	4	—	4	—	4
C b 21	4	1	3	—	3
C b 30	4	1	3	—	3
C c 15	4	—	4	—	4
C c 21	4	—	4	—	4
C c 30	4	—	4	—	4
T c 15	4	—	4	—	4
T c 21	4	—	4	1	3
T c 30	4	—	4	—	4
	60	3 sur 60	57	2 sur 57	55 sur 57
Témoins	—	—	4	3 sur 4	1 sur 4

Nous constatons que 55 sur 57 animaux vaccinés résistent à l'épreuve, ce qui constitue un résultat très satisfaisant. Malheureusement, il faut déplorer le développement d'une poliomyélite clinique sur 3 porcs parmi 60 vaccinés.

#### B. — Durée de l'immunité dans la vaccination par voie nasale.

Le 24 janvier 1963, nous avons vacciné 20 animaux âgés de 60 jours avec A 25 conservé à — 30° C. Nous avons eu 3 cas de paralysie entre le 12<sup>e</sup> et le 18<sup>e</sup> jour après la vaccination avec deux guérisons. Les 19 porcs restants ont été confiés à un autre service pour des essais de nutrition. L'épreuve a été faite 6 mois après la vaccination. Dans l'intervalle, 5 animaux moururent pour des raisons diverses sans présenter aucun signe clinique ni histologique d'encéphalomyélite. Sur les 14 animaux restants, nous n'avons rien observé après l'épreuve. L'immunité conférée par la vaccination nasale dure au minimum 6 mois.

#### C. — Essais de vaccination dans les élevages particuliers.

La méthode de vaccination par aérosols a fait l'objet d'essais hors du laboratoire, d'abord dans certains élevages où la maladie venait de se manifester, ensuite dans d'autres élevages.

— Dans trois élevages de la région de Tananarive, nous avons pu faire les observations suivantes :

Elevage n° 1

Effectif : 12 animaux

Situation lors de l'intervention (vaccin + hyaluronidase) : 1 porc malade paralysé.

Résultat : Mort du malade, mais pas d'autre cas à signaler.

Elevage n° 2

Effectif : 50 porcs

Situation lors de l'intervention (vaccin + hyaluronidase) : 10 morts et 3 malades.

Résultat : Mort des 3 malades, puis arrêt de l'épizootie.

Elevage n° 3

Effectif : 9 animaux

Situation lors de l'intervention (vaccin + hyaluronidase) : 1 porc mourant

Résultat : 4 porcs sont atteints dans les deux jours qui suivent et mourront en moins de 7 jours après vaccination. 4 porcs resteront indemnes.

— La vaccination a été réalisée dans des élevages indemnes, où les propriétaires formellement prévenus nous l'ont demandée. Le bilan est résumé dans le tableau III.

TABLEAU N° III

	1964	1965
Tananarive	320	30
Majunga	290	130
Tamatave	133	300
	<u>743</u>	<u>460</u>

Les vaccinations se sont passées sans incidents post-vaccinaux sauf dans un cas, en fin 1964 à Majunga, où plusieurs porcs présentèrent des paralysies dans les jours qui suivirent.

Cet incident nous a contraint à limiter nos interventions, et le nombre total des vaccinations par aérosols a dû être diminué en 1965 par rapport à 1964.

Une exception cependant : la région du Lac Alaotra (Province de Tamatave) où la maladie continue de sévir à l'état endémique ; plusieurs éleveurs, devant le danger permanent de contamination de leur troupeau nous demandent instamment la vaccination par aérosol qu'ils jugent plus efficace que la vaccination sous-cutanée.

#### CONCLUSIONS

La vaccination par aérosols donne de bons résultats pour l'immunisation des porcelets, contre la poliomyélite du porc à Madagascar, sous réserve que l'on utilise un virus-vaccin vivant, atténué par passages successifs en culture de cellules épithéliales de rein de porcelet.

Nous avons été amenés à effectuer jusqu'à 25 passages pour éliminer le pouvoir pathogène de la souche. Mais, même à ce stade, on constate un résidu de pouvoir pathogène, qui peut faire apparaître une maladie clinique chez quelques animaux vaccinés. Dans nos expériences, on a pu observer jusqu'à 3 cas pour 60 vaccinés. Dans la pratique, sur plus de 1.000 vacci-

nations, le nombre de cas s'est montré inférieur à 1 p. 100.

Si l'on tient compte de l'efficacité de la vaccination par aérosols, qui protège solidement un pourcentage très élevé d'animaux, ainsi que de la durée de l'immunité qui est supérieure à six mois, on peut la conseiller dans toutes les régions où la maladie demeure endémique, mettant les élevages en perpétuel danger.

Les risques de maladie post-vaccinale nous paraissent suffisamment faibles pour être compatibles avec de bonnes conditions d'élevage.

Au cas où l'on doit intervenir dans un élevage où la maladie a déjà fait son apparition, il nous paraît recommandable d'utiliser l'hyaluronidase qui hâte la diffusion du virus-vaccin, et permet d'obtenir une immunité plus précoce, dans un délai d'environ cinq jours.

Il est regrettable que la conservation du virus-vaccin n'ait pu être portée à un degré élevé, car la commodité de transport aurait été facilitée. La lyophilisation entraîne une bien trop forte diminution des unités virulentes pour pouvoir être retenue. L'adjonction de produits « conservateurs » n'a pas eu d'effets très heureux.

On pourra néanmoins compter sur une assez bonne résistance naturelle du virus-vaccin, et effectuer des transports de courte durée à la température ordinaire, si l'on effectue une remise à l'armoire frigorifique dès la réception, jusqu'à l'utilisation.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire  
des Pays tropicaux  
Laboratoire Central de l'Elevage  
Tananarive.*

## SUMMARY

### **Pig Polio-encephalomyelitis in Madagascar. Vaccination trial with aerosols**

Vaccination trials against pig Polio-encephalomyelitis by means of aerosols have been carried out in Madagascar. Decisive results have been obtained by this method using live virus vaccine. Because of some cases of post vaccinal infection the vaccine is only to be used in infected areas.

The development of the immunity is quicker by use of hyaluronidase. Research in order to improve the titre of the virus and the conservation of the vaccine-virus has been unable to bring out decisive methods.

## RESUMEN

### **Encefalomiélitis porcina en Madagascar. Ensayos de vacunación mediante aerosoles**

En Madagascar, se hicieron ensayos de vacunación contra la poliomiélitis del cerdo mediante inhalación de aerosoles.

El método tuvo éxito por medio de un virus vacuna vivo. A causa de algunos casos de enfermedad postvacunal, no se puede utilizar la vacuna más que en las zonas contaminadas. El hialuronidasa apresura la aparición de la inmunidad. Investigaciones para mejorar el título virulento, y la conservación del virus vacuna no permitieron obtener métodos concluyentes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOURDIN (P.), BUCK (G.), JACOTOT (H.). — *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1958, IX, 17.
2. SERRES (H.). — *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1960, XIII, 245.
3. DULBECCO (R.) et VOGT (M.). — *J. exp. Méd.* 1954, 99, 167.
4. YOUNGER (J. S.). — *Proc. Soc. exp. Méd.* 1954, 85, 202.
5. DANIEL (Ph.), DEPOUX (R.). — *Ann. Inst. Past.* 1957, 92, 703.
6. LEPINE (P.), SLIZEWICZ (S.), DANIEL (Ph.) et PACCAUD (M.). — *Ann. Inst. Past.* 1956, 90, 654.

7. EAGLE. — *Proc. Soc. exp. Méd.* 1955, 89, 96.
8. LEPIE (P.), DANIEL (Ph.), PELMONT (J.), SLIZEWICZ (P.). — *Ann. Inst. Past.* 1957, 92, 567.
9. BACHTOLD (J. G.), BUBEL (H. C.) et GE-BHARDT (L. P.). — *Virology* 1957, 4, 582.
10. WALLIS (C.) et MELNICK (J. L.). — *Virology* 1962, 16, 122.
11. EATON (M. D.), ADLER (L. T.), BOND (Ph.), SCALA (A. R.). — *J. Inf. Dis.* 1956, 98, 239.
12. ROIZMAN (B.). — *Proc. nat. Acad. Sci.* 1962, 48, 973.
13. SIGEL (M.) et BEASLY (A. R.). — *Proc. Soc. exp. Méd.* 1955, 88, 86.
14. KAARIAINEN (L. J.), HALONEN (P.). — *Ann. méd. exp. Biol. Fenn.* 1962, 17, 288.
15. MANDEL (B.). — *Virology* 1962, 17, 288.
16. REY (L.), GREAVES et Coll. — *R. I. N. Traité de Lyophilisation*. Hermann 1960, Paris.
17. MUGGLETON (P. W.). — **Recent research in freezing and drying**. Blackwell scient. publ. Oxford, 1960, 229.
18. SUREAU (P.), BRYGOO (E. R.). — *Ann. Inst. Past.* 1962, 102, 123.
19. RENOUX (G.). — *Ann. Inst. Past.* 1962, 103, 290.
20. WALLIS (C.) et MELNICK (J. L.). — *Texas Reports Biol. med.* 1961, 19, 681.
21. MELNICK (J. L.), ASHKENAZI (A.), MIDUL-LA (V.), WALLIS (C.) et BERNSTEIN (A.). — *J. amer. med. Ass.* 1963, 85, 406.
22. WALLIS (C.) et MELNICK (J. L.). — *Virology* 1962, 16, 504.
23. MELNICK (J. L.), WALLIS (C.). — *Proc. Soc. exp. Biol. med.* 1963, 112, 894.
24. POHJANPELTO (P.). — *Virology* 1958, 6, 472.
25. JAVILLIER (M.), POLONOWSKI M.), (FLOR-KIN (M.), BOULANGER (P.), LEMOIGNE (M.), ROCHE (J.), WURMSER (R.). — **Traité de biochimie générale**. Masson édit.
26. OBAYASHI (Y.). — *Bull. Wild. Health Ogr*, 1956, 14, 657.